

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-518624

(P2001-518624A)

(43)公表日 平成13年10月16日(2001.10.16)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 1	G 0 1 N 33/543	5 2 1 2 G 0 4 2
31/20		31/20	
33/533		33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁)

(21)出願番号 特願2000-514137(P2000-514137)
 (86) (22)出願日 平成10年9月10日(1998.9.10)
 (85)翻訳文提出日 平成12年3月21日(2000.3.21)
 (86)国際出願番号 PCT/US98/19225
 (87)国際公開番号 WO99/17119
 (87)国際公開日 平成11年4月8日(1999.4.8)
 (31)優先権主張番号 08/938, 585
 (32)優先日 平成9年9月26日(1997.9.26)
 (33)優先権主張国 米国 (US)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), J P

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・ワシントン
 アメリカ合衆国ワシントン州98105, シアトル, ノース・イースト・フォーティファイブス・ストリート 1107
 (72)発明者 ウ, カイカイ
 アメリカ合衆国 ワシントン 98125, シアトル, エヌ. イー. 105ティーエイチ プレイス 2538
 (72)発明者 ウェイグル, バーンハード エイチ.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98103, シアトル, デンスモア アベニュー 4306
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 同時の粒子分離および化学反応

(57)【要約】

本発明は、試料液体（より大きな粒子を含み、特に血液）中の分析物粒子の存在を検出するための方法および装置を提供する。これは拡散を利用して、より大きな粒子の濾過と、分析物粒子の反応とを、同時に行う。試料流れと試薬流れとが、層流反応チャネルの上流端で合流し、隣接する層流中を流れる。この試薬は、溶液であり得、またはビーズ上に固定され得る。分析物粒子は試料流れから拡散して試薬流れに入り、後により大きな粒子を残して、残留試料流れとする。試薬流れ中で分析物粒子が試薬粒子と反応し、生成物粒子を形成して、これによって生成物流れを作り出す。反応チャネルの下流端において、残留試料流れおよび生成物流れが分離される。生成物粒子は次いで、好ましくは光学的に、生成物流れ中で検出される。検出の前に、生成物流れはさらなる濾過または分離に供され得、または第二の試薬流れと合流して二次生成物粒子を形成し得る。この装置および方法を、酵素によりまたは蛍光によりラベル化した免疫試薬を用いた競合的免疫検定法またはサンドイッチ免疫検定法を行うために、用い得る。この装置および方法はま

た、生成物を合成するためにも用い得、この場合には、2つの試薬流れが層流反応チャネル内で合流する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 より大きな粒子をも含有する一次流れからの小さい一次粒子を反応させる方法であって、以下の工程：

該一次流れを第一の層流反応チャネルに導入すること；

第一の試薬粒子を含有する第一の試薬流れを、該第一の反応チャネルに、別に導入して、該一次流れおよび該第一の試薬流れが隣接した層流中を流れるようにすること；

該小さい一次粒子を該一次流れから拡散させて該第一の試薬流れに入らせ、該第一の試薬粒子と反応させて第一の生成物粒子を形成させ、これによって該第一の試薬流れを第一の生成物流れに変化させ、該一次流れを該より大きな粒子を含有する残留一次流れに変化させること；

前記残留一次流れを該第一の反応チャネルの外へ導くこと；および

該第一の生成物流れを該第一の反応チャネルの外へ、別に導くことを含む、方法。

【請求項2】 前記第一の生成物粒子を検出する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記第一の生成物粒子を検出する前記工程が、光学的、電気的、熱量測定的、および化学的検出からなる群から選択される方法を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記検出する工程が、吸光度、発光、または蛍光の検出を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 以下の工程：

前記第一の生成物流れを第二の層流チャネルに導入すること；

第一の伴侶流れを該第二の層流チャネルに別に導入して、該第一の生成物流れおよび該第一の伴侶流れが隣接した層流内で流れるようにすること；および

該第一の生成物流れ中または該第一の伴侶流れ中の小さい粒子をこれらの間で拡散させ、これによって該第一の生成物流れを拡散した第一の生成物流れに変え、該第一の伴侶流れを拡散した第一の伴侶流れに変えることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記拡散した第一の生成物流れを前記第二の層流チャネルの外へ導く工程、および前記拡散した第一の伴侶流れを該第二の層流チャネルの外へ別に導くことをさらに含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 以下の工程：

前記拡散した第一の生成物流れを、第三の層流チャネルに導入すること；

第二の伴侶流れを該第三の層流チャネルに別に導入すること；および

該拡散した第一の生成物流れ中または該第二の伴侶流れ中の小さい粒子をこれらの間で拡散させること

をさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 以下の工程：

前記拡散した第一の伴侶流れを第三の層流チャネルに導入すること；

第二の伴侶流れを該第三の層流チャネルに別に導入すること；および

該拡散した第一の伴侶流れ中または該第二の伴侶流れ中の小さい粒子を、これらの間で拡散させること

をさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記第一の伴侶流れが抽出流れであり、ここで前記第一の生成物粒子が該抽出流れ中に拡散する、請求項5に記載の方法。

【請求項10】 前記第一の伴侶流れが、第二の試薬粒子を含有する第二の試薬流れであり、ここで該第二の試薬粒子が前記第一の生成物粒子と反応して、第二の生成物粒子を形成する、請求項5に記載の方法。

【請求項11】 前記第二の生成物粒子を検出する工程をさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記第一の試薬粒子が、ビーズ上に固定されている、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 前記ビーズが磁気性のビーズである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記第一の生成物粒子を単一粒子検出を用いて検出する工程をさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 前記残留一次流れを分析する工程をさらに含む、請求項1

に記載の方法。

【請求項16】 前記一次流れが血液であり、前記小さい一次粒子が天然の抗原であり、そして前記第一の試薬粒子が第一の抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記第一の抗体がラベル化した抗原と結合しており、ここで前記天然の抗原および該ラベル化した抗原が該第一の抗体上の結合部位と競合する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記試薬流れがさらに第二の抗体を含有し、ここで前記第一の抗体および該第二の抗体が、前記天然の抗原と共に、サンドイッチ錯体を形成する、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 より大きな粒子をも含有する一次流れ中の小さい一次粒子を反応させるためのマイクロチャネルシステムであって、以下：

上流端、下流端、第一の側面、および第二の側面を有する、第一の層流チャネル；

該第一の層流チャネルの該上流端の該第一の側面に接続された、一次流れインレットチャネル；

該第一の層流チャネルの該上流端の該第二の側面に接続された、第一の伴侶流れインレットチャネルであって、これによって該一次流れおよび該第一の伴侶流れが隣接する層流内で流れる、第一の伴侶流れインレットチャネル；

該第一の層流チャネルの該下流端の該第一の側面に接続された、残留一次流れアウトレットチャネル；

上流端および下流端を有する第一の生成物流れチャネルであって、該生成物流れチャネルの該上流端が該第一の層流チャネルの該下流端の該第二の側面に接続されている、第一の生成物流れチャネル；

上流端および下流端を有する第二の層流チャネルであって、該上流端において該第一の生成物流れチャネルの該下流端に接続されている、第二の層流チャネル；および

該第二の層流チャネルの該上流端に接続された第二の伴侶流れインレットチャネルであって、これによって該第一の生成物流れおよび該第二の伴侶流れが隣接

する層流中で流れる、第二の伴侶流れインレットチャンネルを有する、マイクロチャンネルシステム。

【請求項20】 前記第二の層流チャンネルの下流端に接続された検出チャンネルをさらに有する、請求項19に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項21】 前記検出チャンネルが光学的にアクセス可能である、請求項20に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項22】 前記検出チャンネルが渦を巻いている、請求項21に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項23】 前記検出チャンネルがフローサイトメーターチャンネルを有する、請求項20に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項24】 前記フローサイトメーターチャンネルがシースフロー (sheath flow) モジュールを有する、請求項23に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項25】 前記フローサイトメーターチャンネルがv字溝である、請求項23に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項26】 上流端および下流端を有する第一のアウトレット流れチャンネルであって、該上流端が前記第二の層流チャンネルの前記下流端に接続されている、第一のアウトレット流れチャンネル；および

該第二の層流チャンネルの該下流端に接続されている、第二のアウトレット流れチャンネル

をさらに有する、請求項19に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項27】 前記第一のアウトレット流れチャンネルの前記下流端に接続された検出チャンネルをさらに有する、請求項26に記載のマイクロチャンネルシステム。

【請求項28】 上流端および下流端を有する第三の層流チャンネルであって、該上流端が前記第一のアウトレット流れチャンネルの前記下流端に接続されている、第三の層流チャンネル；および

該第三の層流チャンネルの該上流端に接続された第三の伴侶流れインレットであって、これによって前記第一のアウトレット流れおよび前記第三の伴侶流れが隣

接する層流中で流れる、第三の伴侶流れインレット

をさらに有する、請求項26に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項29】 上流端および下流端を有する第三の層流チャネルであって、該上流端が前記第二の層流チャネルの前記下流端に接続されている、第三の層流チャネル；および

該第三の層流チャネルの該上流端に接続されている、第三の伴侶流れインレット

をさらに有する、請求項19に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項30】 前記第一の層流チャネルの前記上流端に接続された第三の伴侶流れインレットチャネルをさらに有する、請求項19に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項31】 前記第一の層流チャネルの前記下流端に接続された第二の生成物流れアウトレットチャネルをさらに有する、請求項19に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項32】 前記システムが、チャネルが形成された基板、および該基板に接着されたカバープレートから形成される、請求項19に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項33】 前記一次流れインレットおよび第一の伴侶流れインレットの配置が、前記一次伴侶流れおよび第一の伴侶流れが、並んだ層流中で、該第一の層流チャネル中を流れるような配置である、請求項32に記載のマイクロチャネルシステム。

【請求項34】 前記一次流れインレットおよび第一の伴侶流れインレットの配置が、前記一次伴侶流れおよび第一の伴侶流れが、層流中で、前記第一の層流チャネル内を流れるような配置である、請求項32に記載のマイクロチャネルシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、分析物粒子およびより大きな粒子の両方を含有する流れ中の、これらの分析物の濾過および化学反応に基づく同時の拡散に関する。本発明は、例えば、血液を分析して小さい粒子（例えば細胞を含有する流れ中の抗原など）の存在を検出するため、または小体積の液体生成物を調製するために、有用である。

【0002】

(発明の背景)

チャネルサイズが1ミクロンほど小さい、複雑な流体システムを組み立てることが可能である。これらの装置はさほど費用がかからずに大量生産され得、単純な分析試験に、速やかに広範囲に用いられることが予測される。しかし、濁った流体、特に血液の化学的分析においては、細胞のようなより大きな粒子の濾過を、特に光学的分析においては、通常は分析の前に行う必要がある。臨床実験室においては、これは一般に、遠心分離によって行われる。生じる遠心力は、中心からの距離の関数であり、したがって遠心分離は小スケールの装置においては効果的ではない。化学実験室においては、メンブランフィルターを用いてこれらのより大きな粒子を分離する。これは微小スケールの装置において用い得るが、使用中にこれらのフィルターが詰まるので、実用的ではない。

【0003】

小さい粒子がより大きな粒子と比べてより拡散することを用いて、これらの種を部分的に分離し得る。拡散とは、大スケールにおいては容易に無視し得るプロセスであるが、微小スケールにおいては急速に重要となる。このような構造においては内部力が極めて小さいため、実際上は微細構造中の全ての流れは層流である。これによって、チャネル中で互いに隣り合う、異なる層の流体および粒子が、拡散以外で混合することなく、移動し得る。さらに、このようなチャネルにおいては横方向の距離が小さいため、拡散は、分子および小さい粒子をそれらの拡散係数（これは通常それらのサイズの関数である）にしたがって分離するための、強力な道具である。

【0004】

本発明は、拡散を利用して同時に濾過および化学反応を起こし、これによって、粒子成分を含有する標本の前処理の排除を促進し、したがって試料のサイズおよび必要な分析時間を減少させる。

(発明の要旨)

本発明は、より大きな粒子をも含有する溶液中において、小さな粒子を反応させるための方法および装置を提供する。これは、より大きな粒子の濾過と、小さい粒子の反応とを同時に行う。この反応容器は次いで、反応生成物の回収または検出に用いられ得る。この反応容器は拡散を利用して、小さい一次粒子をより大きな粒子から分離する。これは微小スケールチャネルを利用するが、ここでは拡散が重量な因子となり、またここでは流体流は層流である。この反応容器は単純かつ費用をかけずに製造され得、使用後は処分し得る。この反応容器には、約0.01 μ lと約20 μ lとの間の体積の流体を、数秒のうちに処理する能力がある。 μ lより小さい体積の試料流体を用いての操作は、高価な試薬において、または血液の分析において、特に有利である。より大きな体積、およびそれと対応してより長い時間は、例えばウイルスの負荷 (viral load) が低い試料中のウイルスの検出のように、好ましければ、用いられ得る。

【0005】

この反応容器は分析のために用いられ得、この場合には、インレット流体 (これは、一般的に一次流体と呼ばれる) は、試料流体であり、小さい粒子 (これは、一般に小さい一次粒子と呼ばれる) は、分析物粒子である。この場合には、この反応容器は一般的に、検出器と組み合わせられる。あるいは、この反応容器を用いて小体積の生成物流体を迅速に合成し得る。この場合には、一次流体は試薬流体であり、小さい一次粒子は試薬粒子である。これには、生成物を天然の基質から始めて作るという特定の応用がある。以下に、この反応容器を分析の実施態様について記載するが、この記載はまた合成の実施態様にも応用される。

【0006】

本発明は、「H」型反応容器を用いる。このH-反応容器内において、Hのクロスバーが層流反応チャネルである。このクロスバーの上流における端部におい

て、試料（一次）流れおよび試薬流れがHの別個のアームを通じて入り、これらの試料流れおよび試薬流れが、クロスバー中で隣接した層流で流れる。この流れが層流であるので、これら2つの流れの乱れた混合はないが、分析物粒子が拡散して試料流れから試薬流れへと入り、後により大きな粒子を残して残留試料流れとする。試薬流れ中において、これらの分析物粒子が試薬粒子と反応して生成物粒子を形成し、これによって生成物流れを作り出す。クロスバーの下流端において、残留試料流れおよび生成物流れが分離して、Hの2つの下流のアームに入る。生成物粒子が次いで生成物流れ中で検出される。

【0007】

生成物粒子の検出を行うには、光学的、電気的、化学的、電気化学的、または熱両測定的分析、あるいは分析の分野における任意の他の技術を用い得る。1つ以上の検出技術を同一のシステム内において用い得る。好ましい実施態様は、光学的分析、または電気化学的および光学的分析の組み合わせを用いる。光学的検出においては、生成物流れを発光、蛍光または吸光度によって分析し得る。検出ゾーンの信号を増加させるために、生成物流れチャネルを広くするか、または渦巻き状にし得る。生成物流れは、分析のためにフローサイトメータに、とくに微小に作製されたフローチャネルを有するフローサイトメータに、接続され得る。

【0008】

この方法のある応用の1例は、溶液状態での競合的免疫検定法においてである。試料流れは、天然の抗原を含有する全血である。試薬粒子は、蛍光によりラベル化された抗原に結合された、抗体である。反応チャネル中で、この天然の抗体が拡散して試薬流れに入り、蛍光によりラベル化した抗原と置き換わる。この生成物流れは、天然の抗原、および蛍光によりラベル化した抗原の両方を含有し、これらのいくらかは遊離しており、いくらかは抗体と結合したままである。蛍光によりラベル化した抗原の遊離したものと結合したものの相対量（これは、血液中の天然の抗原の両の関数である）が、測定され得る。

【0009】

検出の前に、生成物流れはさらに濾過または分離に供され得る。特に、この生成物流れを分離チャネル内において抽出流れと合流させて、生成物流れおよび抽

出流れが隣接する層流流れ中で流れるようにし得る。生成物流れ中のより小さい粒子が検出（好ましくは光学的検出）のために、抽出流れに流れ込む。

【0010】

分離チャネルの使用の例は、上記のような競合的免疫検定法であり、ここで抗体-蛍光によりラベル化した抗原錯体が微小ビーズ上に固定される。分離チャネル中で、蛍光によりラベル化した抗原の、遊離したものと結合したものとが拡散によって分離される。抽出流れに入る遊離した抗原は、ビーズ上の抗原に妨害されることなく、蛍光によって検出され得る。拡散による分離の代わりに、生成物流れをフローサイトメーターに結合して、ビーズ上に残った蛍光強度を測定し得る。このビーズは磁性物質であり得、磁場を用いてビーズをこの試料流れ中に固定して、分析物粒子と反応させ得る。反応の後で、逆磁場（reverse field）がこれらのビーズを試薬流れに戻す。

【0011】

検出プロセスは、第二の試薬流れを用い得、この流れは、「T」配置において生成物流れと合流する。これら2つの流れは隣接した層流中で流れ、生成物流れからの小さい生成物粒子が拡散して第二の試薬流れに入るか、または第二の試薬流れからの小さい試薬粒子が拡散して生成物流れに入る。この拡散プロセスに依存して、これらの流れのいずれかまたは両方において、生成物粒子が第二の試薬粒子と反応して、二次生成物粒子を形成する。この二次生成物粒子は、上で一次生成物粒子について述べたように、検出される。

【0012】

第一の、および第二の試薬流れは、例えば、サンドイッチ免疫検定法において有用である。第一の試薬は一次抗体であり、これは試料からの抗原と結合して第一の生成物を形成する。この第一の試薬は十分大きいので、この錯体の拡散係数を変化させ得る。第二の試薬は蛍光によりラベル化された二次抗体であり、これは第一の生成物と反応してサンドイッチ錯体を形成する。この錯体は、上で一次生成物について述べたように検出される。この錯体の拡散が錯形成していないラベル化した抗体よりも遅いことを用いて、これらの種を拡散によって分離することにより、または蛍光の脱分極（extent of depolarizat

ion) の伸長により、これら2つを区別する。

【0013】

第二の試薬流れはまた、第一の反応が、蛍光によってではなく、酵素によりラベル化した試薬を含む場合にも、用いられる。酵素によってラベル化した試薬粒子の、結合したものおよび結合していないものの酵素活性の差により、反応の進行度を測定し得る。第二の試薬流れを通じて、酵素感受性の基質が第一の反応生成物と合流する。この基質と酵素との反応が、次いで、上で一次生成物について述べたように検出される。

【0014】

第一の、または次の生成物流れは、遅延線を通じて流れ得、これによってその反応が、検出の前に、または次の試薬流れが合流する前に、完了する。第一の、または次の生成物流れはまた、検出の前に、または次の試薬流れが合流する前に、濾過または拡散による分離に共され得る。これらの試薬は磁性のビーズ上に固定され得、磁場を用いて、これらのビーズを、反応またはフラッシュの工程のために、任意の反応チャンネル内に固定し得る。

【0015】

試料流れは、分析物を含み、より拡散しにくい粒子をも含む、あらゆる流れであり得、例えば、血液または他の体液、汚染された飲料水、汚染された有機溶媒、生物工学的プロセスの試料（例えば、発酵肉汁）などである。分析物は試料流れ中のあらゆるより小さい粒子であり得、これには、より大きな粒子よりも速く試薬流れ中に拡散する能力があり、これによってそのより大きな粒子を残留試料流れ中に実質的に残す。分析物粒子の例は、水素、カルシウム、ナトリウムおよび他のイオン、溶存酸素、アルブミンなどのタンパク質、アルコールおよび糖のような有機分子、薬剤（サリチル酸、ハロセン、および麻薬など）、殺虫剤、重金属、有機および無機ポリマー、ウイルス、小細胞および他の粒子である。好ましい実施態様（ここで、試料流れは全血である）においては、抗原のような小さい粒子が拡散してチャンネルを迅速に横切り、一方血球のようなより大きな粒子はゆっくり拡散する。

【0016】

試料流れ中のより大きな粒子はまた、試薬感受性でもあり得る。これらは試薬流れ中に拡散しないので、これらは分析物の検出には干渉しない。分析物が拡散し、より大きな粒子は拡散しないことによって、試薬の、より大きな試料成分への相互感受性 (cross-sensitivity) (これは、ありふれた問題である) が、回避され得る。さらに、この試薬は、溶液中に保持され得、この中で、その試薬はその最適な性質を示す。例えば、pHまたはイオン強度に対する相互感受性が、強く緩衝化された試薬溶液を用いることによって、抑制され得る。

(発明の詳細な説明)

本発明は、以下の同時係属特許出願に関し、これらは全て、全文が本明細書中に参考として援用されている：米国特許出願番号第08/625, 808号、“Microfabricated Diffusion-Based Chemical Sensor” 1996年3月29日に出願され、今は特許になっている；米国特許出願番号第08/829, 679号、“Microfabricated Diffusion-Based Chemical Sensor” 1997年3月31日に出願された；米国特許出願番号第08/900, 926号、“Simultaneous Analyte Determination and Reference Balancing in Reference T-Sensor Devices”、1997年6月25日に出願された；米国特許出願番号第08/621, 170号、“Fluorescent Reporter Beads for Fluid Analysis”、1996年3月20日に出願された；米国特許出願番号第08/663, 916号、“Microfabricated Differential Extraction Decive and Method”、1996年6月14日に出願された；米国特許出願番号第08/534, 515号、“Silicon Microchannel Optical Flow Cytometer”、1995年9月27日に出願された；PCT第96/15566号、“Silicon Microchannel Optical Flow Cytometer”、1996年9月27日に出願された；米国特許出願番号第08/

823, 747号、"Device and Method For 3-Dimensional Alignment of Particles in Microfabricated Flow Channels"、1997年3月26日に出願された；米国特許出願番号第08/876, 038号、"Adsorption-Enhanced Differential Extraction Device"、1997年6月13日に出願された；米国特許出願番号第60/049, 533号、"Method For Determining Concentration of a Laminar Sample Stream"、1997年6月13日に出願された；米国特許出願番号第08/938, 584号、"Device for Rapidly Joining and Splitting Fluid Layers"、本願と同時に提出された；出願番号第08/938, 093号、"Multiple Analyte Diffusion Based Chemical Sensor"、本願と同時に提出された。

【0017】

本発明のチャネルセルおよび方法は、全ての流れが層流になるように実行されるように設計される。一般的には、これは、マイクロチャネルのサイズが、そのチャネル中の流れのレイノルズ数が約1より小さい、好ましくは約0.1より小さい、装置において達成される。レイノルズ数とは、慣性の粘度に対する比である。レイノルズ数が低いということは、慣性が本質的に無視できること、乱流が本質的に無視できること、および2つの隣接する流れが層流であること、すなわち、これらの流れが、上記のように、粒子の拡散による以外には混合しないことを意味する。流れは、レイノルズ数が1より大きい場合に層流となり得る。しかし、このようなシステムは、その流れパターンが乱された場合に、乱流を生じさせる傾向がある。例えば、その流れの流速が変化した場合、または流れの粘度が変化した場合である。本発明の好ましい実施態様は液体流れを用いるが、これらの方法および装置はまた気体流と共に用いるにも適している。

【0018】

本発明のH反応容器を、図1aに平面図で、図1bに断面図で示す。このチャ

ネルセルは、基板1およびカバープレート2を有するH反応容器を含む。試料（一次）流れ11がインレット3を通して試料流れインレットチャンネル10に入る。この試料は、分析物（小さい一次）粒子12およびより大きな粒子13を含有する。「粒子」という用語は、あらゆる種（溶解したものを含む）、および粒子種（例えば、分子、細胞、懸濁および溶解した粒子、イオン、および原子）を表わす。この実施例においては、試料は全血であり、分析物は抗原であり、そしてより大きな粒子は血球である。試薬流れ21は、R1でも示すが、インレット4を通して試薬流れインレットチャンネル20に別に入る。「別に」という用語は、流れチャンネルを共有するよりもむしろ個々に有する流れについて用いられる。この例においては、試薬粒子は抗体23であり、これはラベル化した抗原22と結合している。）

【0019】

試料流れおよび試薬流れは反応チャンネル30において合流し、ここでこれらは隣接した層流を流れ、伴侶流れとも呼ばれる。「隣接した」という用語は、本明細書においては、図1に示すような隣り合った流れと、図13に示すような層流との両方に用いる。試料流れは反応チャンネルの一方の側に入り、試薬流れは他方の側に入る。「側」という用語は、本明細書においては、図1のチャンネル30におけるような、左右、および図13のチャンネル30におけるような、上下の、両方を表わす。

【0020】

反応チャンネル中の流れが層流であるので、これらの流れの乱れた混合がない。しかし、拡散混合により、小さい分析物粒子が拡散して試薬流れに入り、その試薬粒子と反応して、生成物粒子を形成する。この拡散する方向は深さと呼ばれてdのラベルを付けられ、これと直交する方向は幅と呼ばれてwのラベルを付けられる。この実施例においては、天然の抗原とラベル化した抗原とが、抗体の結合部位のために競合する。反応容器の端部によって、試薬流れが第一の生成物流れP1となり、試料流れが残留試料流れとなる。この残留試料流れ41は、残留試料流れアウトレットチャンネル40およびアウトレット5を通して出、生成物流れ51は生成物流れチャンネル50に流れ込む。）

【0021】

図示した実施態様においては、チャンネル30内での反応は、抗原と抗体との間の錯形成である。「反応」という用語は、本明細書において用いる場合は、分析物粒子と試薬粒子との間の反応であって、検出可能な変化をもたらすあらゆるものを含む。それは、化学反応、物理的結合、吸着、吸収（例えば、分析物粒子が、ゼオライトのような多孔性の試薬粒子の内部に吸収される場合）、抗体反応、核酸結合、イオン対形成、イオン交換、クロマトグラフタイプの反応、およびレセプターホルモン反応を含む。

【0022】

生成物流れは生成物粒子検出チャンネルに流れ込む。生成物粒子という用語は、この生成物流れ中の全ての粒子を表わす。これらは、例えば、反応によって形成した新たな種、または、濃度が分析物との反応の程度に依存する試薬粒子であり得る。図1の実施例においては、天然の抗原と置換された、ラベル化した抗原および抗体が、いずれも生成物粒子である。本発明の検出チャンネルは、外部の検出手段と連結されて、分析物粒子と接触した結果生成物流れ内を運ばれる、試薬粒子の変化を検出するようにし得る。検出および分析は、当該分野において公知の任意の手段により行われ、光学的手段（例えば、分析物にさらすと色または他の性質が変化する化学指示薬による、吸収分光法、発光または蛍光）、電気的手段（例えば、装置に挿入した電極）、電気化学的手段、放射性手段、または、磁気共鳴技術を含む当該分野において公知の、実質的にあらゆる微量分析技術、あるいは、イオン、分子、ポリマー、ウイルス、DNA配列、抗原、微生物、または他の因子のような分析物の存在を検出するための、当該分野において公知の他の手段を含む。イオンまたは化学感受性の電界効果が、検出チャンネル内で測定され得る。好ましくは光学的手段が用いられ、抗体、DNA配列などが光学的マーカーに取り付けられる。検出チャンネルの例をあとで述べるが、以下はH反応容器のさらなる実施態様の記載である。

【0023】

異なる反応機構を図2に示す。分析物14は抗原である。試薬流れ21は、一次抗体26およびラベル化した二次抗体27の、2つのタイプの試薬粒子を含有

する。両方の抗体が抗原と反応して生成物粒子を形成し、これが生成物チャネル50を通して出る。二次抗体は、例えば、蛍光により、発光により、または酵素により、ラベル化され得る。第一の抗体は十分に大きく、錯体の拡散係数を十分に減少させて、ラベル化した抗体の、錯形成したものと錯形成していないものとの間を拡散によって区別し得る。

【0024】

試薬粒子はレポーター粒子であり得、図3に示すように、ビーズ上に固定されてレポータービーズ24を形成する。各々のレポータービーズは、少なくとも1つのタイプのレポーター分子を複数固定されたビーズからなる。レポータービーズの性質（例えば、蛍光、発光、吸光度、または化学的活性）は、対応する分析物に対して感受性である。レポータービーズを用いることによって、複数の分析物を、単一の試薬インレットを通じて、同時に測定し得る。なぜなら、これらのビーズを異なるレポーター分子によってラベル化し得るからである。このレポータービーズは、本明細書においては、競合的免疫検定法と共に示す。これは、サンドイッチ免疫検定法または他のレポーター分子と共に用い得る。

【0025】

試薬粒子は、図4に示すように、磁性レポータービーズ25であり得る。反応チャネル30内では、過渡的磁場35がこれらのビーズを試料流れに引き込んで、分析物と反応させる。この磁場を次いで逆転させて、これらのビーズを分析のために生成物流れに引き戻す。

【0026】

H反応容器の次に、生成物流れは検出チャネルに流れ込む。多数の検出手段を用い得るが、光学的検出が好ましい。この検出チャネルは、吸光度、発光または蛍光測定により、プローブされ得る。試薬粒子の吸光度は反応によって変化し得、その検出チャネルは透過によって監視され得る。この実施態様については、チャネルセルは光学的に透明な材料（例えば、ガラスまたはプラスチック）によって作製される。外部の光学的装置は非常に単純であり得る。センサーが一方の側において光源（例えば、電球および拡散手段）によって照射され得、吸光度が他方の側においてカメラを用いて検出され得る。あるいは、試薬粒子の蛍光が分析

物に応答して変化し得、この場合にはその蛍光がモニターされ得る。あるいは、反応生成物が発光体であり得る。反射測定のために、そのチャネルセルの背面が透明である必要はなく、好ましくはシリコンのような反射性材料で作製される。

【0027】

光学的検出のために、その信号は、図5に示すような渦を巻いた検出チャネルを用いて増加され得る。生成物流れPが、その検出チャネルに入る。結合した抗原22aと結合していない抗原22bとの間には光学的特性に差がある。それは例えば、色、蛍光強度、または蛍光の分極の度合いの差であり得る。この実施態様においては、検出チャネル100は一連の曲がり角を有し、方形波の構造を作っている。流れチャネルは任意の多数の方法で渦を巻かれ得る。他の実施態様においては、この流れチャネルはコイルの形状である。渦を巻いたチャネルの代わりに、このチャネルは、図6の検出チャネル110に示すような広がった領域を含み得る。外部の光源および光検出器がこの検出チャネルの周囲に配置されて、吸光度または蛍光を測定する。発光の場合には、光検出器のみが必要である。

【0028】

図7の実施態様においては、光学的測定は、結合していない抗原を拡散によって分離することによって、促進される。生成物流れが生成物流れチャネル121（これは、間に入る要素がなければ、H反応容器の生成物流れチャネル50である）を通過して、検出チャネルシステム120に入る。抽出流体流れ124が抽出流れインレット122を通過して入る。この抽出流体は、生成物流れから拡散する粒子を受容する能力がある任意の流体であり得る。好ましい抽出流れは、水および等張液（例えば、塩水、または、アセトン、イソプロピルアルコール、エタノールのような有機溶媒、あるいは生成物粒子または検出手段を妨害しない、他の便利な液体）を含む。これらの流れは、合流チャネル123内で合流して、隣接した層流となる。分離および検出の両方が、この合流チャネル内で起こる。遊離した抗原22bは、結合した抗原22aより迅速に拡散する。結合した抗原と結合していない抗原との間で選択するために、光照射または検出をチャネル123の側面に焦点合わせする。

【0029】

光学的検出の他の実施態様は、単一粒子検出を用い、例えば、図8に示すフローサイトメーター検出チャンネル130のようなものである。生成物流れは、フローサイトメーターのために一列縦隊になった粒子を含有する。これは特に、レポータービーズ24を含有する生成物流れについて、適切である。図示する通り、より小さい粒子は必ずしも一列縦隊である必要はない。フローサイトメーターの1つの実施態様は、v字溝フローチャンネルを使用する。このv字型チャンネルは、1995年9月27日に出願された米国特許出願第08/534,515号に記載されており、これはその全文が本明細書中に参考として援用されている。このようなチャンネルの断面はVの字のようであり、したがってv字溝チャンネルと呼ばれる。このv字溝は好ましくは幅が十分に小さく、粒子を強制的に一列縦隊とするが、十分に大きく、最も大きな粒子が詰まることなく通過する。レーザー、およびv字溝流れチャンネルと共に用いるように適合された小角度および大角度の光検出器を有する、光学ヘッドが、利用され得る。

【0030】

流れチャンネルを通じて一列縦隊の粒子流れを達成する代替の方法は、シースフローモジュールであり、これは、1997年3月26日に出願された米国特許出願第08/823,747号に開示されており、その全文が本明細書中に参考として援用されている。シースフローモジュールは、試料インレットの前後に、それより幅の広い、鞘流体インレットを有する。生成物流れは鞘流体に囲まれて、この鞘流体が集まって一列縦隊の粒子を作り出す。

【0031】

本発明の二重検出の実施態様においては、残留試料流れ41はフローサイトメーターに接続される。あるいは、この流体流れはまずフローサイトメーターを通り、次にH反応容器を通して流れ得る。これにより、分析物粒子のより小さいものとより大きいものとの両方を独立して検出し得る。例えば、溶解していない分析物と溶解した分析物との両方、または抗原と細胞との両方である。

【0032】

本発明のチャンネルセルを用いて、2つの試薬流れを導入し得、第一の試薬流れをH反応容器内に、第二の試薬流れをT反応容器内または第二のH反応容器内の

いずれかに、導入し得る。例えば、サンドイッチ免疫検定法においては、一次および二次抗体は、図9に示すように、別に導入され得る。このH反応容器は、試料流れインレットチャネル10、第一の試薬流れインレットチャネル20、反応チャネル30、残留試料流れアウトレットチャネル40、および生成物流れチャネル50を有する。この第一の試薬流れは、一次抗体26を含有し、これがその試料中の抗原と反応して、第一の生成物流れP1を形成する。

【0033】

第二の試薬が、第二の試薬流れインレットチャネル60を通して、試薬流れ61(R2)中の第一の生成物に導入される。この第二の試薬流れは、ラベル化した二次抗体27を含有する。この第一の生成物流れおよび第二の試薬流れは、合流チャネル70内で隣接した層流中で流れ、このチャネルが反応チャネルとして機能する。この例示においては、この反応チャネルは十分に長く、第一の生成物粒子と第二の試薬粒子との両方が、その隣接する流れに拡散し得る。1つの実施態様においては、この第一または第二の試薬粒子は磁性のビーズ上に固定されており、磁場を用いてそれらのビーズを反応のためにチャネル70の一方の側に引き寄せる。これらのビーズはそちらの側に残り得るか、または逆磁場によって他方の側に引き寄せられ得る。

【0034】

第二の生成物流れP2は、チャネル70を通して流れ71内に出る。第一および第二の試薬インレットを有することは、例えば、望ましくない副反応を進行させて、第二の試薬を加える前に終了させるために、有用である。粒子が第一の生成物と第二の試薬流れとの間で拡散して、第二の生成物を形成する。第二の生成物流れ71が次いで、検出チャネル(例えば、図5～図8に示すような光学的検出チャネル)に入る。

【0035】

一般的に言えば、流れ61は第一の生成物流れに対する伴侶流れである。小さい粒子がこの伴侶流れと第一の生成物流れとの間で拡散(これは、第二の層流チャネル70内で起こる)した後、これらの流れは、拡散した第一の生成物流れ、および、拡散した伴侶流れと呼ばれる。

【0036】

第二の試薬チャネルの他の応用は、生成物粒子の化学的検出である。上記の例においては、試薬粒子は蛍光によりラベル化されている。これらはあるいは、例えば、酵素によるラベル化のように、化学的にラベル化され得る。図10の実施態様においては、第一の試薬中の抗原は酵素によりラベル化されている。第一の生成物流れはH反応容器（図示せず）から流れ出て生成物流れチャネル50に入る。これは、結合した抗原22aをいくらかと、試料からの天然の抗原によって抗体から除かれた、結合していない抗原22bをいくらか含む。酵素活性は、結合した抗原と結合していない抗原とで異なり、典型的には、結合していない抗原がより活性である。第二の試薬流れ61中の酵素基質粒子62が、第二の試薬流れインレットチャネル60を通して入る。合流（反応）チャネル70内で、これらはラベル化した抗原と反応して、酵素生成物粒子72を生成する。第二の反応流れ71は検出チャネルに流れこみ、酵素生成物を、光学的に、または他の方法で、検出する。検出された酵素生成物の量から、その試料流れ中の抗原の量が計算され得る。

【0037】

さらに他の実施態様においては、試薬粒子62は第一の生成物粒子と反応して、化学発光生成物または生物発光生成物を形成する。その発光が光学的に検出される。化学発光試薬は容易に入手可能である（例えば、“Tropix Luminescence Products”、1997、Perkin Elmer Applied Biosystems、Bedford、Massachusettsを参照）。発光試薬はまた抗体および抗原とも結合して、発光によりラベル化した試薬粒子を作り得る。

【0038】

サンドイッチ免疫検定法においては、第二の抗体は同様に、図11および図12に示すように、酵素によりラベル化され得る。これらの実施態様は、H反応容器とT反応容器との間のHセバレーターを図示する。第一の生成物流れP1は、第一の生成物流れチャネル50を通してH反応容器（図示せず）を去る。図示した実施態様においては、1つのタイプの生成物粒子は、一次抗体26と酵素によ

りラベル化した二次抗体27aとに挟まれた天然の抗原のサンドイッチである。このサンドイッチ生成物粒子は、図2に示すように単一の工程で、または図9に示すように二工程で、形成され得る。この生成物流れは、結合したラベル化した抗体27aと、結合していないラベル化した抗体27bとの両方を含有する。これらを相対的な化学的活性により区別するよりはむしろ、これらは第二の反応の前に、拡散によって分離され得る。

【0039】

これらの実施態様はHセパレーターを含む。生成物流れはチャネル50を通じて入り、伴侶流れ（抽出流れ81）は抽出流れインレット80を通じて入る。これら2つの流れは、分離チャネル85内を、隣接した層流内で流れる。より小さい生成物粒子が、結合していない抗体の場合には、サンドイッチ錯体よりも速く、抽出流れ内に拡散する。これら2つの生成物流れ（より大きな粒子を含有する残留第一の生成物流れP1'、およびより小さい粒子を含有する拡散した第一の生成物流れP1''）は分離されて、それぞれチャネル92および90に入る。

【0040】

図11の実施態様においては、より大きな粒子がT反応容器に入る。反応チャネル70内では、生成物流れは伴侶流れ（第二の試薬流れであり、これは、インレットチャネル60を通じて入る）と隣接して流れる。酵素基質62は転換されて酵素生成物72となり、これは流出して生成物流れP2に入り、次いで検出される。図12の実施態様においては、チャネル90内のより軽い生成物流れが第二の試薬流れと出会い、これはチャネル60を通過して、反応チャネル70に入る。再び酵素基質が転換されて酵素生成物となり、これが次いで検出される。

【0041】

上に示した生成物流れアウトレットに加えて、追加のアウトレットを、標本流れを生成物流れチャネルから導入するために、または反応チャネルの長さによって連続した間隔で、設け得る。標本チャネルは、例えば、反応チャネルまたは生成物チャネルから分枝した、より小さいチャネルであり得る。分析物の濃度をこの標本流れ中で、例えば、ビューポート（view port）、蛍光検出またはフローサイトメーターによって、測定し得る。

【0042】

反応チャネルの長さ、および生成物流れが検出の前に移動する距離は、反応が進行して完了するように、成分のサンプリングをそれらの拡散定数に基づいて制限するように、そして、粒子の分離の効率を変化させるように、選択され得る。この反応チャネルは、小さい分析物粒子が試料流れから拡散し得、そして検出可能な効果を試薬粒子上に有し得るよう、十分に長く、好ましくは少なくとも約2 mmの長さである。必要な拡散時間は、その分析物粒子の拡散係数に依存する。必要な反応時間は、その反応速度に依存する。ある反応（例えば、イオン反応）は、数マイクロ秒以内で終了する。ある反応（例えば、結合した抗原のアプローチを含む競合的な免疫検定法）は、数分を必要とする。分析物粒子と試薬粒子との間の反応により長い時間を許容するために、生成物流れチャネルの長さを増加させ得る。

【0043】

流れチャネルの長さはその構造に依存する。この流れチャネルは直線状または渦巻き状であり得る。渦を巻いたチャネルは、そのチャネルが形成される基板のサイズを増加させることなく、拡散または反応が起こるためのより長い距離を提供し、これによって、拡散係数、または反応速度が小さい分析物を測定することができる。この分析物の拡散係数は、通常その分析物のサイズに逆比例するが、所望の反応チャネルの長さに影響を及ぼす。所与の流速については、拡散係数がより小さい粒子は、試薬流れ中に拡散するための時間を得るために、より長い流れチャネルを必要とする。本発明の好ましい実施態様においては、直線状の反応チャネルのチャネル長は約5 mmと約50 mmとの間である。反応チャネルが渦を巻いている、本発明の実施態様においては、そのチャネルの長さは、そのチャネルがエッチングまたは他の方法で形成される、マイクロチップまたは他の材料のサイズのみにより、規定または限定される。

【0044】

分析物粒子をより拡散または反応させるために、チャネル長を増加させる代わりに、流速を減少させるか、または流れを止めて、反応を進行させ、その後、再び流す。しかし、いくつかの要因が最小の流速を制限する。第一に、流速は典型

的にポンプ手段によって達成され、いくつかのポンプは、粒子の拡散に十分な時間を与えるために要求されると同程度の低い圧力および流速を作り出し得ない。第二に、流速が遅すぎる場合は、周囲の流体より密度の高い粒子がその流れチャネルの底部に沈み得、周囲の流体より密度の低い粒子がその流れチャネルの頂部に浮き得る。流速が十分に速く、流体力学的力が、粒子が底部に沈むこと、頂部に浮くこと、および流れチャネルの壁に付着することを、実質的に防ぐのが、好ましい。いくつかの応用において、特に宇宙で用いる場合には、沈降は要因ではない。沈降は、チャネルセルを層流反応チャネルに垂直に配向することによって、回避し得る。

【0045】

入力した流れの流速は、好ましくは約 $5 \mu\text{m}/\text{秒}$ と約 $50005 \mu\text{m}/\text{秒}$ との間であり、より好ましくは約 $25 \mu\text{m}/\text{秒}$ である。好ましくは、試料流れと試薬流れとの両方の流速は、同じである。

【0046】

チャネルの配置を上記の原理にしたがって調節し、適切なチャネル長、流速、および試料流れと試薬流れとの接触時間を提供することによって、試料流れ中に残る粒子、および試薬流れ中に拡散する粒子のサイズを、制御し得る。必要な接触時間は、その粒子の拡散係数、およびその粒子が拡散しなければならない距離の関数として、計算され得る。より大きな粒子の拡散係数が、分析物の係数より約10倍小さい場合は、生成物流れには実質的に、その大きな粒子がない。

【0047】

本発明のチャネルセルを、そのチャネルセルの表面に平行な平面内で起こる、拡散による分離を用いて、説明した。これを平行実施態様と呼ぶ。これらのチャネルはあるいは、拡散による分離がそのチャネルセルの表面と直交する平面内で起こるように、形成し得る。図13は、直交した面に形成した、H反応容器およびT反応容器の断面図である。これを直交実施態様と呼ぶ。このH反応容器は、試料（一次）流れインレットチャネル10、第一の試薬流れインレットチャネル20、反応チャネル30、残留試料流れアウトレットチャネル40、および第一の生成物流れチャネル50により、形成される。この第一の試薬流れインレット

は、試料インレットと同様、基板を通じて供給し得る。

【0048】

平行な配置においてと同様に、拡散の方向を深さと呼び、 d と表示するが、図13において、この拡散の方向、およびしたがってこの深さは、図1における拡散の方向と直交する。チャンネル30の深さは、2つの流れを収容するために、必要に応じてチャンネル20および50より大きい。このH反応容器は、「H」の文字の外観を有さないが、2つの層流チャンネルが反応チャンネルの上流端において合流して隣接するフロー流れを形成し、この場合には横に並ぶよりもむしろ層になること、および2つの層流チャンネルがその反応チャンネルの下流端から分枝していること、という機能的な基準を有する。

【0049】

図13のH反応容器の生成物流れはT反応容器に入る。このT反応容器は、生成物流れチャンネル50、第二の試薬流れインレットチャンネル60、および反応チャンネル70を有する。チャンネル70の深さは、2つの流れを収容するために、必要に応じてチャンネル50の深さより大きい。前述の実施態様においては（例えば図19を参照）、チャンネル50および60は同一直線上にあった；この実施態様においては、これらは直角に接合している。H反応容器の場合のように、これはT反応容器を規定する「T」の文字の外観を有さず、むしろ、生成物流れチャンネルが伴侶流れインレットチャンネルと合流して、隣接する層流を反応チャンネル内に形成するという、機能的な基準を有する。

【0050】

直交実施態様は、平行の型のものより大きな接触面積を、試料流れと試薬流れとの間に有し得る。直交実施態様における流れチャンネルの幅は増加させられ得、その接触面積を増加させる一方で、層流を保持する。これにより、反応体積がより大きくなり、このことは、この装置の合成の応用において、特に有利である。平行実施態様は、より安価、かつ組み立てがより容易であり、この装置の分析の応用において、特に有利である。

【0051】

平行および直交のいずれの実施態様においても、チャンネルセルは一般的に、表

面が接触した2枚のプレートにより形成される。チャンネルは両方のプレートに形成され得るか、または一方のプレートがチャンネルを有し得、他方が平坦なカバープレートであり得る。本発明のチャンネルセルは、当該分野において公知のあらゆる技術によって形成され得る。シリコンチャンネルプレートは、好ましくは、フローチャンネルをシリコンマイクロチップの水平な表面上にエッチングすること、およびカバープレート（好ましくは、例えばガラスまたはシリコーンゴムのような、光学的に透明な材料）をそのエッチングした基板上に配置することによって、形成される。流れを促進するために、角がエッチングされ得る。シリコンでないチャンネルプレートについては、本発明のチャンネルセルを製造するための他の方法としては、装置をプラスチックで成形すること、微小機械加工、および当該分野において公知の他の技術が挙げられる。本発明の好ましい実施態様においては、チャンネルセルが親水性の表面を有して、その中の流体の流れを促進し、この装置を加圧の必要なしに操作できるようにする。この基質は、このチャンネルの組み立ての後に、当該分野において公知の手段によって処理され得、それを新水性にする。カバープレートはまた、それを新水性にするために、好ましくは、処理される。

【0052】

透過による光学的検出（例えば、吸光度検出）のために、分析物検出領域、および必要に応じて、そのチャンネルセルシステムの他の部分は、光学的にアクセス可能である。典型的には、この検出領域は、光学的に透明なプレートの間にある。分析粒検出領域とは、本明細書で用いる場合は、流れチャンネルの、分析物粒子または試薬粒子の変化が測定される部分を表わす。反射による検出（例えば、蛍光または発光検出）のためには、一方のプレートのみが透明である必要があり、典型的にはカバープレートである。生成物の合成のためには、このチャンネルシステムはいずれの部分も透明である必要がない。

【0053】

好ましいチャンネルの寸法はその応用に依存するが、このとき層流が保持されなければならないという基準がある。チャンネルの深さ（拡散の方向）は好ましくは約 $10\mu\text{m}$ と $1000\mu\text{m}$ との間であり、より好ましくは約 $400\mu\text{m}$ であり、

これは平行および直交の実施態様の両方においてそうである。チャネル幅は、平行実施態様においては約 $10\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ である。直交実施態様においては、数 μm の幅であり得、依然として層流を保持する。

【0054】

この装置を通じて供給する流体の流れに圧力を付与する手段もまた提供され得る。このような手段はインレットおよび／またはアウトレットに設けられ得る（例えば、化学的または機械的手段によって及ぼされる真空）。このような圧力を付与する手段は当該分野において公知であり、水の等または水圧を付与する他の手段、電気浸透力、光学的力、重力、および表面張力の使用が挙げられる。これらのアウトレットは流体受容器に接続され得る。このような受容器は分析または検出装置と組み合わせられ得る。

【0055】

本発明の様々な局面を特定の実施例によって示した。これらの実施態様の組み合わせおよび改変は、当業者により容易に明らかとなり、本発明の精神および範囲内に入る。例えば、例示した配置および反応機構のいかなるものも、ビーズ上に固定された試薬粒子を用いて実施され得る。これらのビーズは磁性であり得、磁場を用いてこれらのビーズを操作し得る。フィルター（拡散に基づくもの、または層でないもの）が、H反応容器の前または後ろに配置され得、および、H反応容器とそれに続く反応容器、セパレーターおよび検出器との間に配置され得る。各々の試薬流れは1タイプより多い試薬粒子を含有し得、1つのタイプの分析物粒子の検出、または複数の分析物の同時の検出を行い得る。1つより多い試薬流れチャネルが反応チャネルの上流端に合流し得、または1つ以上の試薬流れチャネルが、反応チャネルと合流する前に、合流し得る。1つ以上の生成物流れチャネルが反応チャネルの下流端から離れ得る。生成物流れ中の種の検出に加えて、残留試料流れおよび任意の伴侶流れが分析され得る。「H」および「T」の角度は直角に限定されない。平行および直交する構造が1つのチャネルシステムにおいて組み合わせられ得る。この反応容器は、他の試料調製および分析装置との組み合わせにおいて、使用され得る。

(実施例1)

EMIT (酵素増幅免疫測定法) によって実行される試験を、本発明の、T反応容器と組み合わせたH反応容器中で、行い得る。EMITは、低分子量リガンドのための均質免疫検定法である。この検定法は、酵素活性を変化させるために、抗体を、酵素によりラベル化したりリガンドに結合させることに基づく。抗体の、結合したりリガンドおよび結合していないリガンドへの競合的な結合を用いて、結合していないリガンドの濃度を測定する。ここでは、ジゴキシン (不整脈を制御するために用いられ、中毒の場合には頻繁な濃度分析を必要とする薬剤) を、実施例の試験物質として選択する。ジゴキシンのためのEMIT検定法は、試料中の薬剤と、抗体結合部位として組換えDNA技術を用いて作ったグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (rG6P-DH) によりラベル化された薬剤との間の、競合的な結合に基づく。この薬剤の濃度を、酵素活性 (抗体と結合すると減少する) を用いて測定する。活性な酵素はNADを還元してNADHにする。

【0056】

この反応を、図1に、図10と組み合わせて示す。この検定法においては、試薬流れR1が、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼによりラベル化されたジゴキシン22、および抗体23を含有する。試薬流れR1は、チャネル20を通じて導入されて、チャネル10からの試料流れと接触する。試料12中のジゴキシンは拡散してチャネル30内の試薬流れに入り、抗体と結合して、チャネル50に移送され、一方細胞の成分はチャネル40に移送される。より多くのジゴキシン分子が試料流れ中にあるほど、より多くの抗体が、酵素によりラベル化したジゴキシンよりもむしろ、遊離したジゴキシンと結合する。その結果、より多くの酵素が抗体と結合していない。

【0057】

チャネル70内では、生成物流れが試薬流れR2と遭遇する。この試薬流れは、2つのタイプの試薬粒子 (基質のグルコース-6-リン酸 (図示せず) およびNAD62) を含有する。遊離した酵素は、グルコース-6-リン酸を酸化し、そしてNADを還元してNADH72にする。第二の生成物流れ中で、残留酵素活性を、NADHの340nmにおける吸光度の変化を用いて、分光法によって測定する。

(実施例2)

複数の試薬を連続して用いる、他の実施態様においては、試料流れはグルコースを分析するための血液であり、第一の試薬流れR1はグルコースオキシダーゼを含有し、そして第二の試薬流れR2はpH感受性の色素を含有する。チャンネル30中で、グルコース粒子が血液から拡散して試薬流れに入り、グルコン酸に変化する。チャンネル70中で、このグルコン酸がpH感受性色素と反応する。第二の生成物流れ中で、この反応がその色素の吸光度の変化によって検出される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1aおよび図1bを含み、競合的免疫検定法と共に示したH反応容器である。この反応容器を、(a)平面図および(b)断面図で示す。

【図2】 サンドイッチ免疫検定法と共に示したH反応容器である。

【図3】 競合的免疫検定法と共に示したH反応容器であり、ここでは抗体がビーズ上に固定されている。

【図4】 競合的免疫検定法と共に示したH反応容器であり、ここでは抗体が磁性ビーズ上に固定されており、かつここでは磁場を適用してこれらのビーズを反応チャンネルの一方の側に固定している。

【図5】 光学的検出のための、渦を巻いた検出チャンネルである。

【図6】 光学的検出のための、広がった検出チャンネルである。

【図7】 光学的検出と共に用いるための、Tセパレーターである。

【図8】 光学的検出と共に用いるための、単一粒子検出チャンネルである。

【図9】 第一の試薬インレットを有するH反応容器であり、これに第二の試薬インレットを有するT反応容器が続き、サンドイッチ免疫検定法と共に示される。

【図10】 H反応容器との組み合わせで用いるためのT反応容器であり、酵素によりラベル化した抗原の反応と共に示す。

【図11】 H反応容器との組み合わせで用いるためのHフィルターおよびT反応容器であり、サンドイッチ免疫検定法、それに続くサンドイッチ錯体の選択、および、その後の酵素によりラベル化した抗体と基質との反応と共に示す。

【図12】 H反応容器との組み合わせで用いるためのHフィルターおよび

【図 13】 H 反応容器、およびそれに続く、チャネルセル表面に垂直な平面内での拡散を伴う、T 反応容器であり、競合的免疫検定法およびそれに続く酵素によりラベル化した抗原と基質との反応と共に示す。

FIG. 1a

FIG. 1b

【図2】

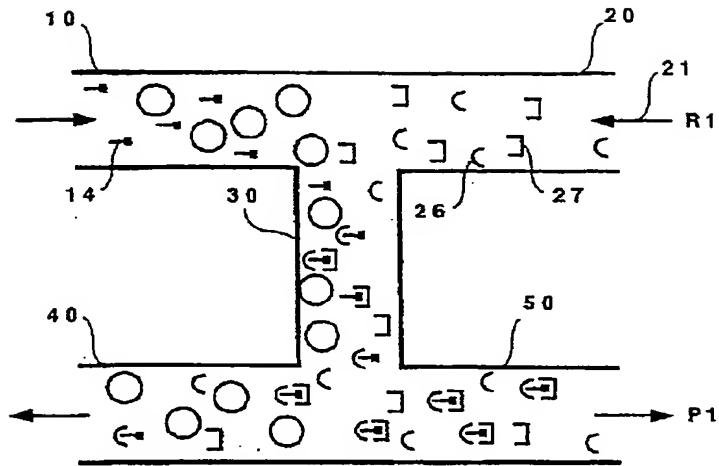


FIG. 2

【図3】

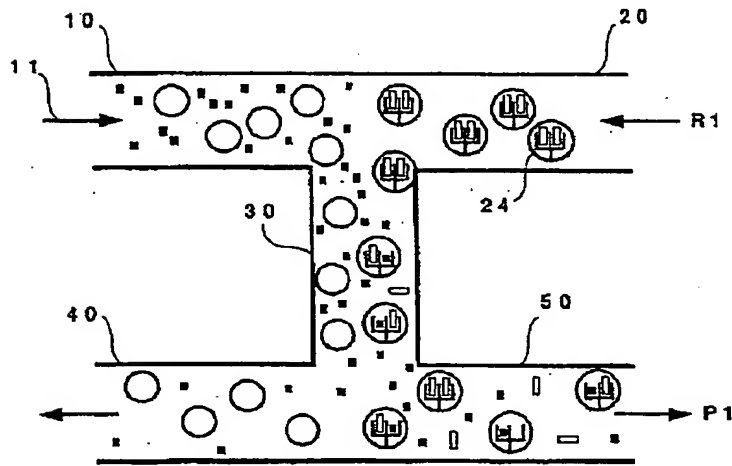


FIG. 3

【図4】

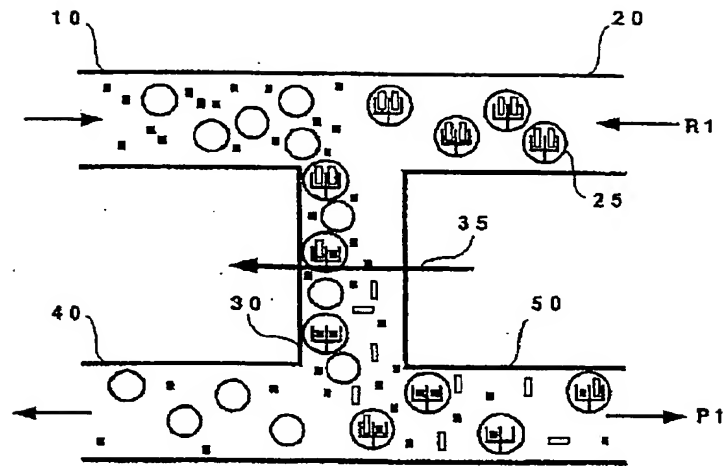
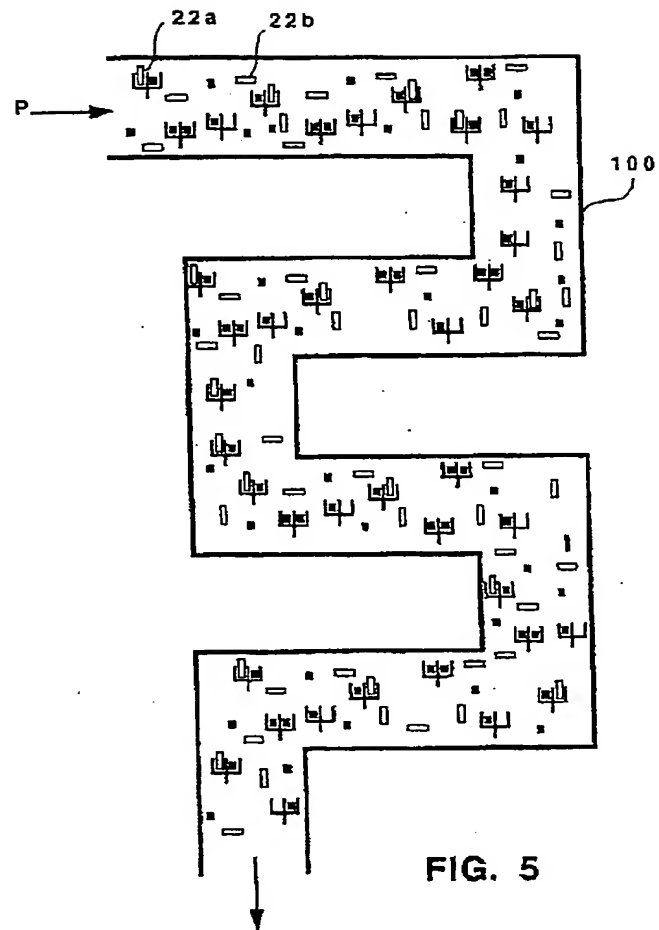
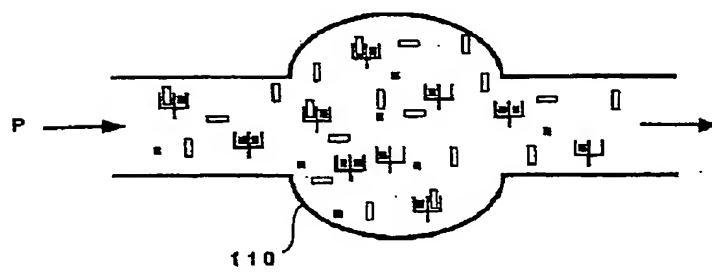


FIG. 4

【図5】



【図6】



【図7】

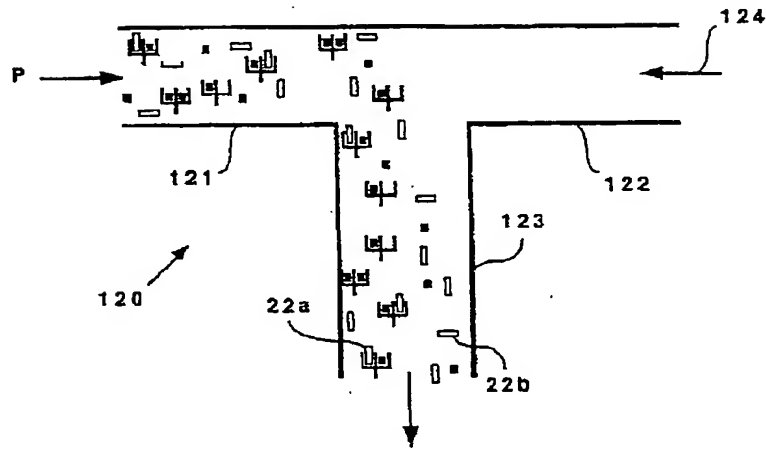


FIG. 7

【図8】

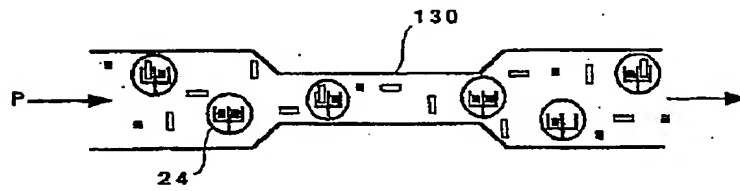


FIG. 8

【図9】

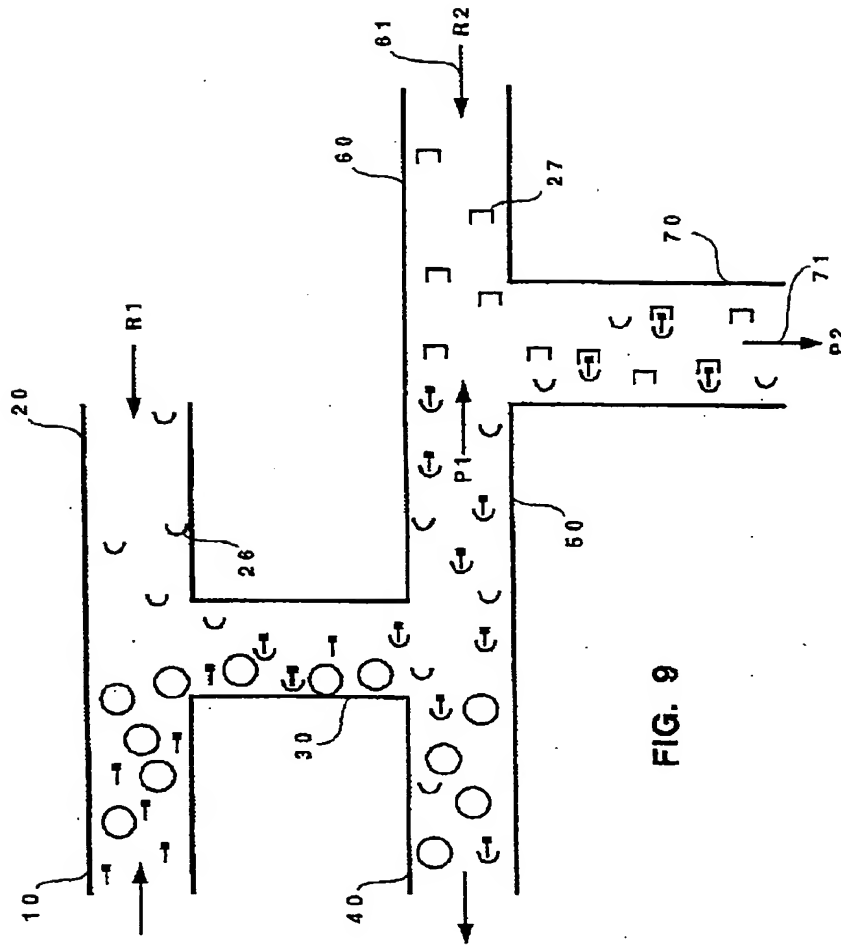


FIG. 9

【図10】

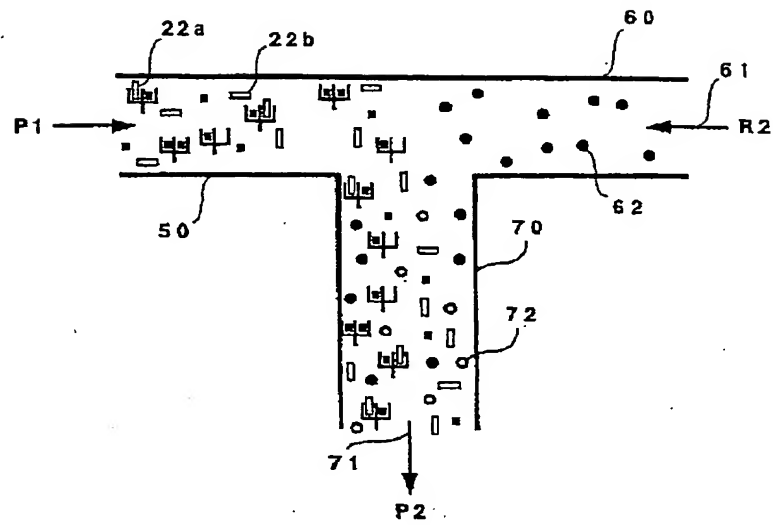


FIG. 10

【図11】

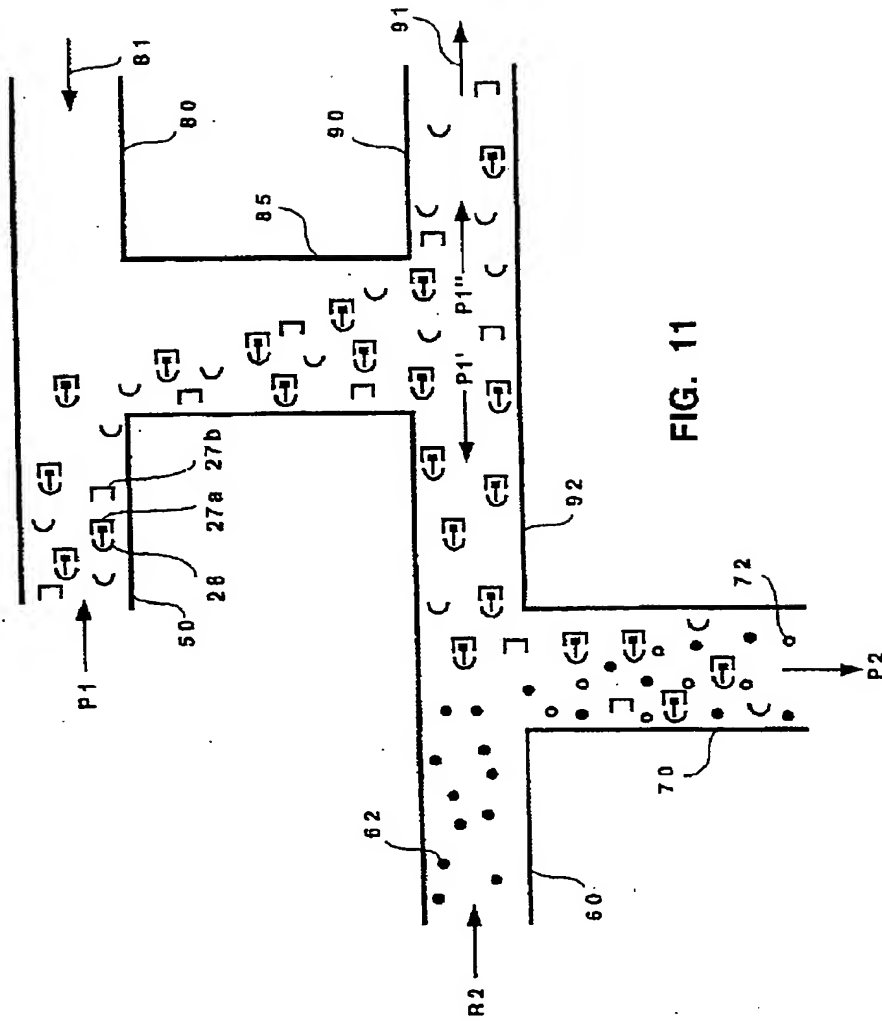


FIG. 11

【図12】

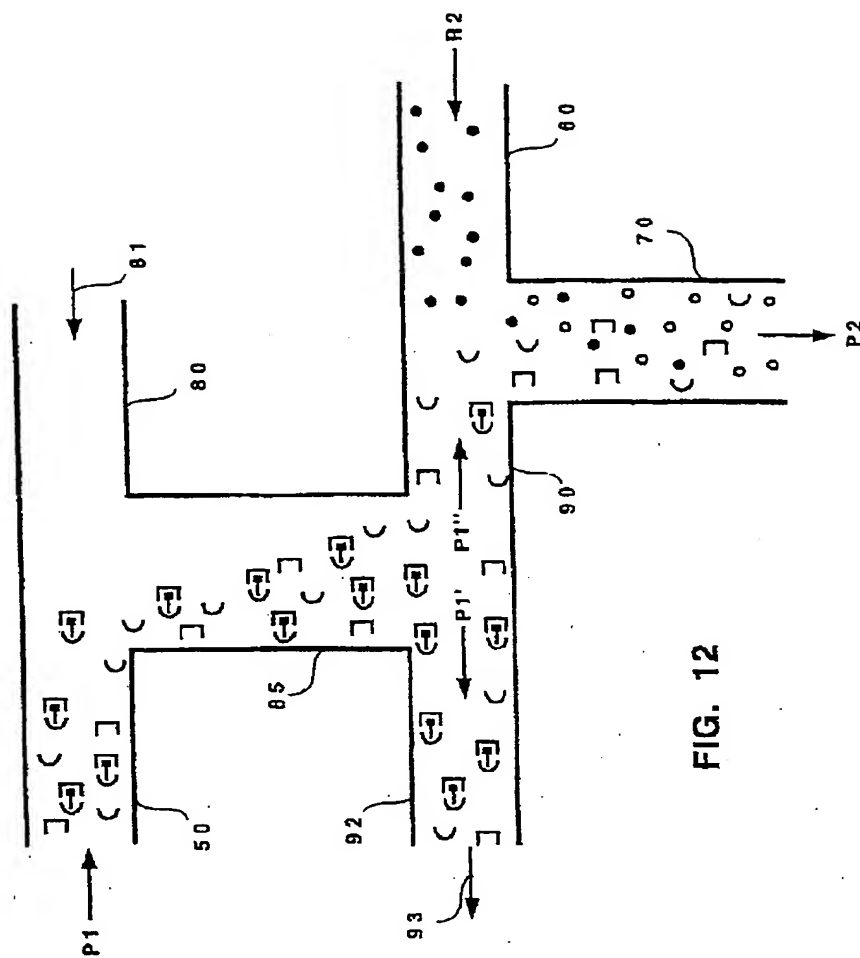


FIG. 12

【図13】

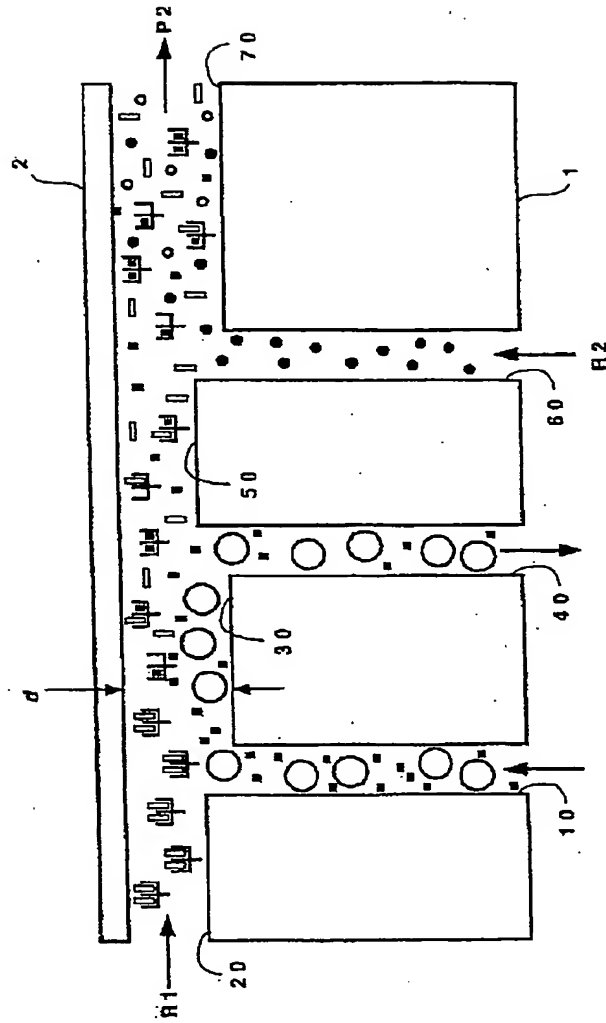


FIG. 13

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/19225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 33/543 US CL : 436/518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/518, 172: 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG search terms: laminar flow, microfluid7, particle7 or 7sphere7 or 7bead7, microchannel7, interact7		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 5,716,852 A (YAGER et al) 10 February 1998, see abstract, claims and entire document.	1-34
Y	US 4,962,037 A (JETT et al) 09 October 1990, see abstract, column 4, lines 6-16, column 7, lines 40-64, and entire document.	1-5, 9-15
X — Y	US 5,427,946 A (KRICKA et al) 27 June 1995, see abstract, figures, claims and entire document.	1, 19 2-18, 20-34
A	US 5,444,527 A (KOSAKA) 22 August 1995, see abstract, claims and entire document.	1-34
Y	US 5,278,048 A (PARCE et al) 11 January 1994, see abstract, claims, example 17 and 18, see entire document.	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 DECEMBER 1998		Date of mailing of the international search report 22 FEB 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer GINNY PORTNER Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/19225

C (Confirmation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 5,156,039 A (GIDDINGS) 20 October 1992, see abstract, claims, figures and entire document.	19 ----- 1-7, 14-15, 20-24
Y	US 5,039,426 A (GIDDINGS) 13 August 1991, see abstract, figures, claims and entire document.	21-28, 31-34
Y	US 4,737,268 A (GIDDINGS) 12 April 1988, see abstract, figures, claims and entire document.	1-34
X	LEVIN, S. et al. Analytical SPLIT fractionation in the diffusion Mode Operating as a Dialysis-like system of membrane. Application to Drug-Carrying Liposomes. Analytical Chemistry, 17 September 1993, Vol. 65, No. 17, pages 2254, 2261, especially page 2255, Figure 1.	19
Y	WO 93/22053 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 November 1993, see abstract, claims and entire document.	1-34
Y,P	US 5,750,063 A (HOYT) 12 May 1998, see abstract, claims and entire document.	1-34
Y,P	US 5,726,404 A (BRODY) 10 March 1998, see abstract, claims and entire document.	1-34
Y,P	US 5,726,751 A (ALTENDORF et al) 10 March 1998, see abstract, claims and entire document.	1-34
X	US 4,894,146 A (GIDDINGS) 16 January 1990, see abstract, figures, claims and entire document.	19
Y,P	US 5,674,743 A (ULMER) 07 October 1997, see abstract, figures, claims and entire document.	1-34
Y	WO 96/04547 A1 (LOCKHEED MARTIN ENERGY SYSTEMS INC.) 15 February 1996, see abstract, claims and entire document.	1-34
X	WO 95/27210 A1 (DANFOSS) 12 October 1995, see abstract, claims and entire document.	1-11, 15, 19-24
X,P --- Y,P	US 5,747,349 A (van DEN ENGH et al) 05 May 1998, see abstract, claims and entire document.	1-6, 9-12, 14-17 ----- 19-27, 30-34, 18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/19225

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 5,726,751 A (ALTENDORF et al) 10 March 1998, see abstract, claims and entire document.	19-25
A	US 4,675,300 A (ZARB et al) 23 June 1987, see abstract, claims and entire document.	1-34

フロントページの続き

(72)発明者 ケニー, マーガレット
アメリカ合衆国 ワシントン 98020,
エドモンズ, ナインス アベニュー
721
(72)発明者 イエガー, ボール
アメリカ合衆国 ワシントン 98105,
シアトル, エヌ. イー. 50ディーエイ
チ ストリート 3719

F ターム(参考) 2G042 AA10 FB05 HA02 HA03